

図 V-56 微生物感染における細胞性および液性免疫応答

ン (IL-1 や TNF- α), TH1 細胞関連サイトカイン (IL-12, IL-18, IFN- γ) や単球走化性ケモカイン (monocyte chemoattractant protein 1: MCP-1 や macrophage inflammatory protein 1 α : MIP-1 α など) が産生され, マクロファージの局所的集積 (肉芽腫), 加えて, 細胞性免疫 (遅延型過敏反応を含む) が誘導される。結核菌感染に対する宿主応答は, 一次感染と二次結核に大別される。

i. 1 次感染

結核菌に未曝露宿主が最初に結核菌を吸入した場合に生ずるが, 細胞性免疫の発現により, 感染防御が成立し, 90%の感染宿主は発病を回避できる。空気感染した結核菌は肺胞マクロファージに貪食され, マクロファージとともに肺門リンパ節に移行する。未活性化マクロファージは抗菌活性を発揮できず, 結核菌はマクロファージ内で発育・増殖, マクロファージを破壊, そして, 周囲の未感染マクロファージに感染する。この過程で, 肺から血行を介して全身播種性感染に至ることもある。

感染約 4~6 週後, すなわち, ツベルクリン皮内反応が成立する時期, 結核菌により活性化された T 細胞とマクロファージの相互作用により細胞性免疫が発現する。この機序に 3 経路が存在する。第 1 の経路は, TH1 細胞が IFN- γ を分泌し, IFN- γ はマクロファージを活性化し, 活性化マクロファージは抗酸菌に対し殺傷能力を有する反応

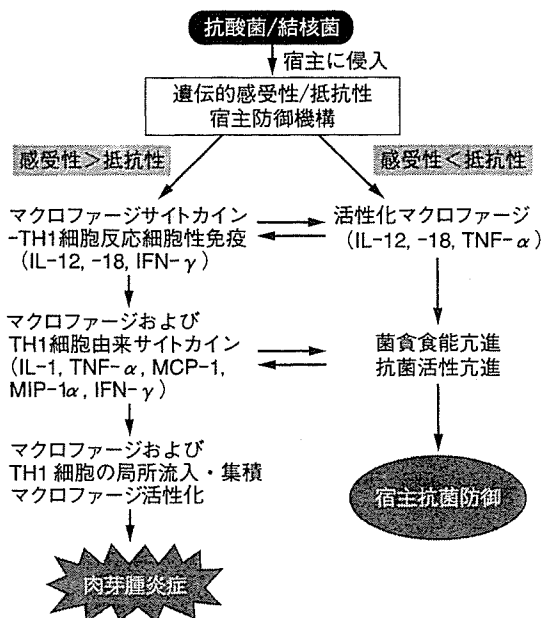


図 V-57 抗酸菌/結核菌感染における宿主細胞および機能分子応答機構

性窒素化合物 (NO, NO₂ や HNO₃) を産生し, 抗結核菌防御を誘導する。この現象は類上皮肉芽腫の形成にも関連している。第 2 の経路は, CD 8⁺T 細胞, すなわち, 細胞傷害性 T 細胞が感染したマクロファージを破壊することにより, 結核菌を殺傷する。第 3 の経路は CD 4⁺ および CD 8⁻T 細胞がマクロファージを破壊し, その結果, 破壊されたマクロファージは乾酪壊死を伴う肉芽腫を形成する。乾酪壊死病巣に存在する抗酸菌は酸性環境

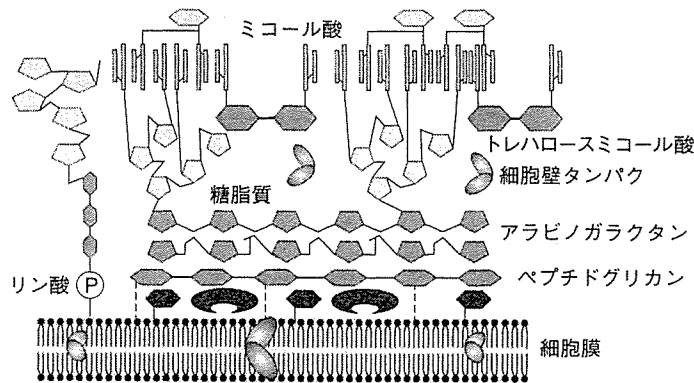


図 V-58 結核菌細胞壁の構造

や低酸素のため、発育・増殖が抑制される。最終的に、1次感染病巣は肺実質と肺門リンパ節の石灰化瘢痕を形成する。

ii. 2次結核と播種性結核

宿主が結核菌既感染し、免疫学的感作が成立している場合、すなわち、外来性再感染、内因性再燃、1次感染病巣から直接、全身播種性結核に進展などがある。これらの誘因には結核菌の高病原性や宿主の易感染性が関与している。2次結核における肉芽腫形成部位は肺尖部に最も多く見られるが、他部位の肺、腎、髄膜や骨髄などにも播種する。これらの肉芽腫病変は結核における組織傷害の主因であり、その機序には遅延型過敏反応が寄与している。2次結核に特徴的な所見は乾酪壊死と空洞形成であり、これらの病変から結核菌が血行を介して全身に撒布、また、気道を介して排泄され、感染源（飛沫核/空気感染）となる。

C. 結核菌感染における宿主応答と細胞壁糖脂質

結核菌の脂質は乾燥菌体重量の10%以上、細胞壁の20%以上を構成し、ほかの一般細菌に比し、きわめて多い。事実、結核菌の全ゲノムは約4.4 Mb (大腸菌：4.6 Mb)であり、タンパクを規定している遺伝子は約4,000、脂肪酸代謝に関与している酵素は250以上、大腸菌が50であることから、結核菌の脂質代謝がきわめて旺盛であることが遺伝

子情報からも判明している²⁾。結核菌細胞壁の脂質として、ミコール酸-アラビノガラクトサン-ペプチドグリカン複合体、リポアラビノマンナン (LAM)、リポマンナン、ホスファチジル-ミオ-イノミトール、硫化脂質 (SL)、トレハロースミコール酸 (TDM)/コード因子、フェノール抽出性糖脂質やリポオリゴ糖などの糖脂質が特徴的である (図 V-58)⁴⁾。

特に、アシル化トレハロース脂質化合物である TDM/コード因子や SL (図 V-59) が結核菌に特徴的であり、結核菌-宿主関係、すなわち病原性や毒性の発現に関与している。また、抗酸性に主として関与する菌体表層成分はミコール酸などの脂質成分であり、ミコール酸は天然でまれな α 位に分枝鎖、 β 位に水酸基を持つ長鎖脂肪酸 (結核菌では炭素数：60~90) である。

宿主マクロファージは結核菌を貪食し、ファゴソームを形成するが、アシル化トレハロース脂質化合物 (SL や TDM) が加水分解酵素を含むリソソームとの融合 (P-L fusion) を阻止することにより、酸性化されず、ファゴソーム内、すなわち宿主細胞内での生存を可能にしている。

肉芽腫炎症は発症機序により、異物性 (T細胞非依存性) および過敏性 (T細胞依存性) に大別 (図 V-60) される。すなわち、TDM を無胸腺ヌードマウスや未免疫マウスに投与することにより、肉芽腫を惹起できること、TDM 免疫マウスでは

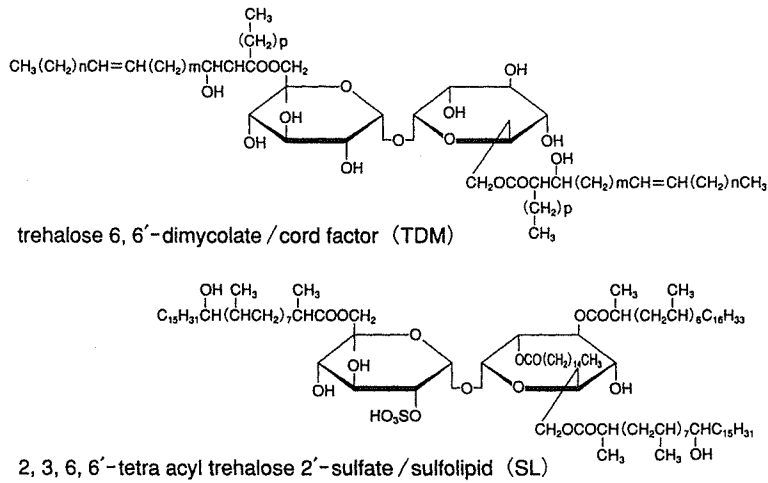


図 V-59 アシル化トレハロース脂質の化学構造

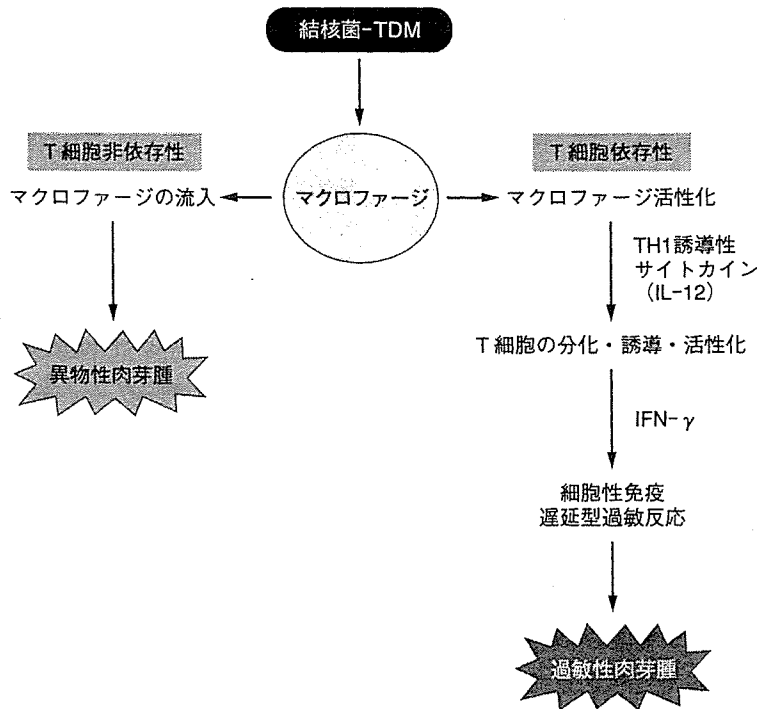


図 V-60 結核性肉芽腫炎症機序と細胞壁 TDM

TDM 誘導肉芽腫が増強されることや遅延型過敏反応/細胞性免疫の指標である足跡腫脹反応が誘導されることから、TDM は異物性および過敏性の両機序を介して、肉芽腫を形成する⁵⁾。事実、TDM 誘導肉芽腫病変は多量の細胞性免疫起動性

サイトカイン (IL-12 や IFN- γ) を含み、活動性に伴い、消長する⁵⁾。したがって、結核肉芽腫の発現に異物性および過敏性の両機序が複合関与し、結核肉芽腫は混合性肉芽腫である。肉芽腫形成には病変局所への血中単球の流入や活性化が必須で

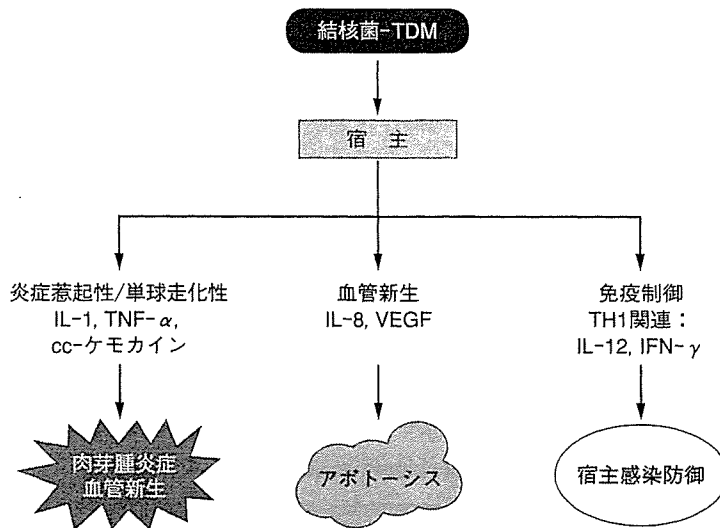


図 V-61 結核菌細胞壁 TDM と宿主応答の分子機構

あり、このため、局所の CC-ケモカイン産生や血管新生が重要な役割を演じる。TDM は血管内皮細胞細胞増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) を誘導し、局所の血管新生に寄与している⁶⁾。加えて、TDM は宿主免疫担当細胞(胸腺や脾臓) にアポトーシスを誘導し、その結果、細胞内寄生病原体の増殖や生存を困難にし、さらに胸腺内自己反応性 T 細胞を除去、TH1/TH2 細胞の分化を制御することにより自己免疫疾患の発症を防止している可能性がある⁷⁾。しかし、SL は P-L fusion 阻止(宿主細胞内生存)を発揮するが、炎症・免疫惹起やアポトーシス誘導活性をまったく示さず、TDM と対照的である⁵⁻⁷⁾。アシル化トレハロース脂質化合物は結核菌の細胞壁表層に存在し、結核菌の宿主細胞内生存、炎症・免疫惹起物質(肉芽腫炎症、遅延型過敏反応、血管新生など)やアポトーシス誘導活性を有する多機能分子である(図 V-61)。

など液性免疫応答を表現するため、抗酸菌細胞壁糖脂質抗原を用いた血清診断が開発されている。結核菌細胞壁糖脂質抗原(TDM)による血清診断は感度(80%)および特異度(95%)であり、特に、喀痰塗抹陰性や培養陰性結核に有用な診断方法であることが示唆されている⁸⁾。

M. avium complex (MAC) 感染症は結核など抗酸菌感染症の約 20% を占める。MAC は環境菌であり、普遍的に存在し、臨床および病原体診断の確定には臨床経過を考慮するため、長期間を要する。MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質(GPL) 抗原(図 V-62)を用いた迅速・簡便血清診断法は感度および特異度ともに良好な成績(90%以上)を示し、また、血清抗 GPL 抗体価は MAC 感染症の疾患活動性を反映した⁹⁾。したがって、GPL 抗原を用いた血清診断は MAC 感染症の診断や疾患活動性の評価に有用であり、今後、臨床応用が期待される。

4 将来展望・臨床応用

a. 抗酸菌細胞壁糖質を抗原とした血清診断

感染宿主は抗酸菌細胞壁糖脂質に対し抗体産生

b. 結核菌の遺伝子情報と医学

i. RD1 と免疫診断

結核菌と bacillus Calmette-Guérin (BCG) は結核菌群に属し、相同性がきわめて高く、BCG は

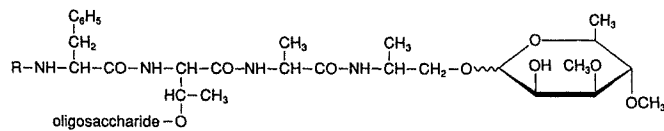


図 V-62 MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) の化学構造

表 V-12 抗結核薬耐性と標的関連遺伝子

抗結核薬	標的関連遺伝子	変異出現率 (%)
イソニアジド	<i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>ahpC</i> , <i>kasA</i>	92
リファンピシン	<i>rpoB</i>	95
ピラジナミド	<i>pncA</i>	97
ストレプトマイシン	<i>rpsL</i> , <i>rrs</i>	70
フルオロキノロン	<i>gyrA</i>	70

乳幼児結核の発病予防ワクチンとして汎用されている。ツベルクリンは結核菌培養濾液から精製されたタンパク抗原であり、ツベルクリン皮内反応 (TST) が臨床応用されている。TST 陽性は結核菌感染、非結核性抗酸菌感染や BCG 接種を示唆し、TST は結核菌感染と非結核性抗酸菌感染や BCG 接種を区別することは不可能である。結核菌感染者の化学予防 (抗結核薬の予防内服) として、結核菌感染者の特定に TST は支障をきたしている。結核菌と BCG のゲノム情報から BCG で欠失している遺伝子領域 (region of deletion, RD1) 産物 (early secreted antigen target 6 : ESAT-6 や culture filtrate protein 10 : CFP-10) は結核菌特異的タンパクであり、TST では識別できなかった結核菌感染、非結核性抗酸菌感染や BCG 接種による TST 陽性を ESAT-6 や CFP-10 抗原による特異免疫反応 (末梢血に RD1 抗原を添加培養し、上清に産生される IFN- γ を定量) で結核菌感染のみを検出することが可能となった¹⁰⁾。RD1 領域を利用した結核菌特異的診断法は潜伏感染の診断、集団感染の広がり の把握や化学予防対象者の選定に有用である。

ii. 薬剤耐性結核菌の迅速診断

主要な抗結核薬 (イソニアジド, リファンピシン, エタンプトール, ピラジナミド, ストレプト

マイシン) に耐性の結核菌は約 10%, 特にイソニアジドとリファンピシンに同時耐性を示す多剤耐性結核菌は約 2% を占め、抗結核化学療法を困難なものにしている。全世界で 5,000 万人以上が多剤耐性結核菌に既感染し、医療費は薬剤感受性結核に比して 3~100 倍を要し、さらに再発率がきわめて高く (28%), 結核制圧対策にとって大きな問題となっている。薬剤感受性試験は結核菌培養系に抗結核薬を添加し、評価されているが、結核菌は遅発育菌のため、結果を得るまで長期間 (固形培地 : 4~6 週間, 液体培地 : 10~14 日間) を要する。結核菌の薬剤耐性は、各抗結核薬の標的に関与した遺伝子の変異により獲得され、多剤耐性はこれらの遺伝子の変異が集積することにより出現する (表 V-12)。したがって、変異遺伝子を検出することにより、培養しなくても迅速・簡便に薬剤耐性結核菌を検出することが可能となり、適正な結核医療に資することが期待される¹¹⁾。

C. 免疫介入を基盤とした新規治療や予防戦略

i. 治療戦略

薬剤耐性結核/抗酸菌感染症に対する新規治療として、TH1 関連サイトカイン (IFN- γ や IL-12) 投与による抗菌防御強化戦略の開発が試みられている^{12,13)}。肉芽腫病変形成と抗菌防御の分子

機序(図V-57)から、TH1 関連サイトカイン投与は肉芽腫病変と抗菌防御の両者を増強することが懸念されてきた。しかし、投与方法の改善(低用量や投与間隔)により、薬剤耐性結核菌の減少と肉芽腫病変の軽減が示唆され、今後の検証作業を要するが、薬剤耐性結核に対する有望な治療戦略となる可能性がある¹⁴⁾。サイトカイン以外の防御増強物質として治療的ワクチン、死菌 *M. vaccae* が注目されている^{15,16)}。*M. vaccae* と抗結核化学療法との併用に関する一定した有効性評価(菌陰性化、治療期間の短縮など)は未了である。

ii. 予防戦略

結核のみならず、感染症対策の基本は予防であり、その最も効果的かつ科学的な戦略は宿主を治療標的とし、その免疫力を有効に活用する免疫介入療法つまり予防接種(ワクチン)であることは過去・現在・将来ともに不変であろう。事実、人類が根絶した唯一の疾患は痘瘡(天然痘)であり、その勝利の原動力はワクチンであった。現行での結核発病予防ワクチンである BCG は乳幼児結核(髄膜や播種性結核)などの初感染結核の予防には有効であるが、主として内因性再燃による成人肺結核には BCG 効果は疑問視されているため、新規結核ワクチンの開発が希求されている。結核ワクチン開発戦略としては、改良型 BCG、弱毒化結核菌、成分ワクチンおよび DNA などの核酸ワクチンがあげられる。RD1 (BCG で欠失している遺伝子)領域を導入した BCG^{17,18)}が前臨床試験で有望視されているが、改良型 BCG や弱毒化結核菌は生菌であるため、HIV 感染者など易感染性宿主への投与は安全性に問題を生じ、接種対象が限定される。成分ワクチンや DNA ワクチンは生菌でないため、安全性に問題はないが、現時点で BCG を凌駕する効果は得られていない。結核ワクチン開発は結核菌-宿主関係の理解に依存し、細胞性免疫(マクロファージ-サイトカイン-TH1 細胞系)を賦活化することが科学的基盤と考えられてきた。しかし、外来性再感染による結核発病¹⁹⁾は TH1 細胞などの免疫学的特異性や記憶が成立し

ないこと、加えて、マクロファージに表現される IFN- γ レセプター-IL-12 情報伝達系の欠陥による抗酸菌感染症²⁰⁾などでは TH1 細胞を中心とした抗結核免疫に疑問を生じ、結核発病が感受性宿主マクロファージ殺結核菌能の内因性欠陥に起因する可能性を示唆する。したがって、抗結核ワクチン開発戦略には T 細胞のみならず、マクロファージ指向性ワクチンを考慮することが望まれる。

おわりに

世界最大の単一病原体感染症、そして代表的再興感染症である結核は 1990~1999 年の 10 年間に累積した結核患者が 8,800 万人、結核死亡数が 3,000 万人に達し、人類の健康に最大の脅威であり、結核制圧対策は将来にわたって重要な課題である。結核制圧目標は喀痰塗抹陽性肺結核罹患率: 0.1/10 万人以下であるが、日本の現状は 9.3 であり、制圧目標にはほど遠く、結核対策中進国である。21 世紀の世界や人類は結核と戦い、制圧/根絶、あるいは共存を指向した道を模索している。教育・環境・行政・社会基盤整備に加えて、感染学(感染の科学)の発展が結核の脅威を克服することを、そして、結核による健康被害を減少させることを期待している。

文 献

- 1) George KM, et al.: Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science*, 283: 854-857, 1999.
- 2) Cole ST, et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393: 537-544, 1998.
- 3) McKinney JD, et al.: Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*, 406: 735-738, 2000.
- 4) Brennan PJ, et al.: The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*, 64: 29-63, 1995.
- 5) Yamagami H, et al.: Trehalose 6,6'-dimycolate

- (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body-and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect Immun*, 69 : 810-815, 2001.
- 6) Saita N, et al. : Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. *Infect Immun*, 68 : 5991-5997, 2000.
 - 7) Hamasaki N, et al. : In vivo administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect Immun*, 68 : 3704-3709, 2000.
 - 8) Maekura R, et al. : Prospective clinical evaluation of the serologic tuberculous glycolipid test in combination with the nucleic acid amplification test. *J Clin Microbiol*, 41 : 1322-1325, 2003.
 - 9) Kitada S, et al. : Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex with an enzyme immunoassay that uses a mixture of glycopeptidolipid antigens. *Clin Infect Dis*, 35 : 1328-1335, 2002.
 - 10) Andersen P, et al. : Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*, 356 : 1099-1104, 2000.
 - 11) Wada T, et al. : Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 42 : 5277-5285, 2004.
 - 12) Kobayashi K, et al. : Interleukin (IL)-12 deficiency in susceptible mice infected with *Mycobacterium avium* and amelioration of established infection by IL-12 replacement therapy. *J Infect Dis*, 174 : 564-573, 1996.
 - 13) Condos R, et al. : Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon- γ via aerosol. *Lancet*, 349 : 1513-1515, 1997.
 - 14) Nolt D et al. : Interleukin-12 therapy reduces the number of immune cells and pathology in lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 72 : 2976-2988, 2004.
 - 15) Johnson JL, et al. : Randomized controlled trial of *Mycobacterium vaccae* immunotherapy in non-human immunodeficiency virus-infected ugandan adults with newly diagnosed pulmonary tuberculosis. The Uganda-Case Western Reserve University Research Collaboration. *J Infect Dis*, 181 : 1304-1312, 2000.
 - 16) Mwinga A, et al. : *Mycobacterium vaccae* (SRL 172) immunotherapy as an adjunct to standard antituberculosis treatment in HIV-infected adults with pulmonary tuberculosis : a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 360 : 1050-1055, 2002.
 - 17) Hsu T, et al. : The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 : 12420-12425, 2003.
 - 18) Pym AS, et al. : Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med*, 9 : 533-539, 2003.
 - 19) van Rie A, et al. : Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med*, 341 : 1174-1179, 1999.
 - 20) Lekstrom-Himes JA, et al. : Advances in Immunology. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med*, 343 : 1703-1714, : 2000.

<p>further reading</p>

1. Bloom BR : Tuberculosis. The global view. *N Engl J Med*, 346 : 1434-1435, 2002.
2. Smith I : *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*, 16 : 463-496, 2003.
3. North RJ, et al. : Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, 22 : 599-623, 2004.
4. Hingley-Wilson SM, et al. : Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunol*, 4 : 949-955, 2003.
5. Young DB : Building a better tuberculosis vaccine. *Nat Med*, 9 : 503-504, 2003.

第2章 病理・病態生理

結核の免疫

要旨

結核は、単一病原体による感染症としては人類に最も健康被害を及ぼしており、全世界で 20 億人（全人口の約 1/3）が結核菌に既感染、毎年 800 万人が結核を発病、200 万人が死亡し、有病者は 2,200 万人である¹⁾。結核菌の病原性の特徴として、① マクロファージに感染し宿主防御機構から逸脱する、② 潜伏感染により宿主からの排除を免れる、③ 遅延型過敏反応を誘導し組織破壊を伴う肉芽腫を形成する、といったことがある²⁾。これらの特徴は、結核菌-宿主免疫応答との相互作用によって生じるものであり、結核の予防・治療戦略の構築には、結核に対する宿主免疫の理解が必須である。

はじめに

肺結核患者から喀痰排泄された結核菌の暴露者の約 30% に結核菌感染が成立し、感染者の約 10% が生涯中に結核を発症する。しかし、発症しない感染者も結核菌の体内からの完全な排除は不可能と考えられる。このことは、90% の感染者は宿主防御機構によって結核菌の増殖を封じ込め発病を回避できるが、結核菌が宿主内で潜伏感染していることを意味する。潜伏感染した結核菌は、老化、免疫抑制療法 [免疫抑制薬、ステロイド剤、抗サイトカイン療法：腫瘍壊死因子 α (TNF α) 阻害薬など]、栄養障害、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染 / 後天性免疫不全症候群 (AIDS) などの宿主免疫機構の低下により、発育、増殖を再開し、結核を発症するに至る。これを内因性再燃と呼ぶ。一般的に成人では、潜伏感染の内因性再燃の形で結核を発症することが多い。一方、小児や HIV 感染 / AIDS 患者では、初感染によって結核を発症しうる。

結核発症を規定する遺伝的因子として、ヒト第 2 染色体に存在する遺伝子 solute carrier family 11 member 1 (SLC11a1) / natural re-

● キーワード

結核菌-宿主関係
細胞性免疫
潜伏感染
サイトカイン
肉芽腫

sistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) が同定された。この遺伝子はマクロファージに発現しており、食胞内から細胞質への鉄イオンの輸送タンパクを規定する。鉄イオンは結核菌の食胞内増殖に必須な物質であり、宿主-結核菌間の鉄の競合により、感染抵抗性を発揮すると考えられる³⁾。

結核菌の既感染の有無は、遅延型過敏反応 (DTH) であるツベルクリン反応や結核菌特異的抗原による末梢血単核細胞インターフェロングamma (IFN γ) 遊離試験 (QuantiFERON-2G[®] など) によって判定されるが、ツベルクリンに対する免疫応答は結核再燃における生体防御に必ずしも役立っていないと考えられる。事実、現行ワクチンであるBCGは一次結核の発症予防に極めて有効であるが、潜伏感染からの再燃である成人の結核にはほとんど無効である。すなわち、初感染やBCG接種によって誘導される初感染に有効な免疫応答は、再燃を阻止する免疫応答と異なることが考えられる⁴⁾。

結核菌初期感染における防御免疫

結核菌感染は主として生菌を含む飛沫核の吸入によって成立する。気道を介し侵入した結核菌は、肺胞マクロファージによって貪食される。一般的な細菌はマクロファージ食胞内で殺菌されるのに対し、結核菌はマクロファージ食胞体 (ファゴソーム) と多量の加水分解酵素を含む水解小体 (リソソーム) の融合を阻害することにより、食胞内pHの低下を伴う食胞の成熟を防ぎ、食胞内で生存し続ける細胞内寄生細菌である (表1)。

静止期にあるマクロファージは細胞内結核菌の殺菌を行うことはできないが、IFN γ などの物質で活性化されると食胞が成熟して菌を融解するとともに、反応性酸素化合物 (ROI) や反応性窒素化合物 (RNI) 産生を誘導し、結核菌を殺菌することができるようになる。したがって、結核菌感染防御にかかわっている宿主防御因子は、自然免疫だけではなく、マクロファージ、サイトカイン、CD4陽性1型ヘルパーT (Th1) 細胞の協調が必要である。加えて、CD8陽性キラーT細胞 (CTL) による感染マクロファージ傷害や細菌の直接障害も重要な宿主防御因子であると考えられている。 $\gamma\delta$ T細胞やCD1拘束性T細胞は、脂質抗原など非タンパク性抗原を認識する免疫機構

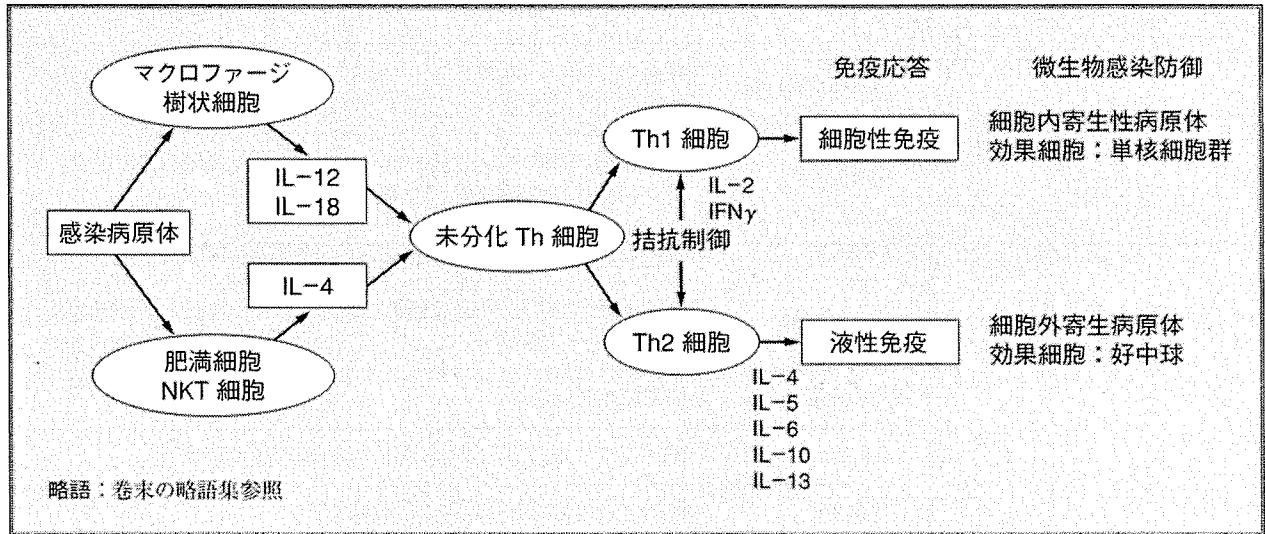
表1 結核菌の特徴

細胞内寄生性	桿菌 (0.2 ~ 0.6 × 1 ~ 10 μm), 宿主細胞, 特にマクロファージ内で抗菌機構から逃れて増殖
細胞壁	脂質成分が豊富なため疎水性であり, 化学物質にも安定, グラム染色に難染色性, 抗酸性
好気性	酸素分圧の高い臓器 (肺など) で増殖し, 病変を形成
遅発育性	至適温度: 37 °C, 倍加時間: 約 12 ~ 15 時間, 培養集落形成に 4 ~ 8 週間
感染形式	飛沫核/空気感染
病原性	慢性炎症, 肉芽腫, 乾酪壊死, 空洞形成, 線維化
遺伝子	全ゲノム (約 4.41 Mb) の解読

として近年注目されている⁵⁾。一部のT細胞はメモリーT細胞へと分化し, 再燃の際に速やかに効率よく免疫応答を誘導し, 再発を防ぐように働くと考えられる。

感染マクロファージや結核菌抗原を補足した樹状細胞は肺門リンパ節などの所属リンパ節へ走化し, リンパ節において感染マクロファージあるいは樹状細胞は細胞表面の主要組織適合性抗原複合体 (MHC) に結核菌抗原を提示する。その後, 結核特異的T細胞を誘導し, 初期獲得免疫応答が成立する⁶⁾。結核菌成分を Toll 様受容体 (TLR) などによって認識することで, 活性化された抗原提示細胞は Th1 指向性サイトカイン: インターロイキン (IL)-12 や IL-18 を産生し, 抗原特異的 CD4 陽性T細胞を典型的な Th1 細胞へ分化させ, これらの細胞が大量の IFN γ , TNF α やリンホトキシン α (LT α) などの Th1 サイトカインを産生する (図1)⁷⁾。分化したT細胞は感染局所へ移動し, 結核特異的免疫応答を増強させる。しかし, Th1 細胞-サイトカイン-マクロファージ相互作用でマクロファージが活性化されても完全な菌の排除は達成できず, 一部のマクロファージ内結核菌は増殖を停止し, 代謝も低下させて休眠状態となり, 潜伏感染へと移行する。

図1 微生物感染における細胞性および液性免疫応答

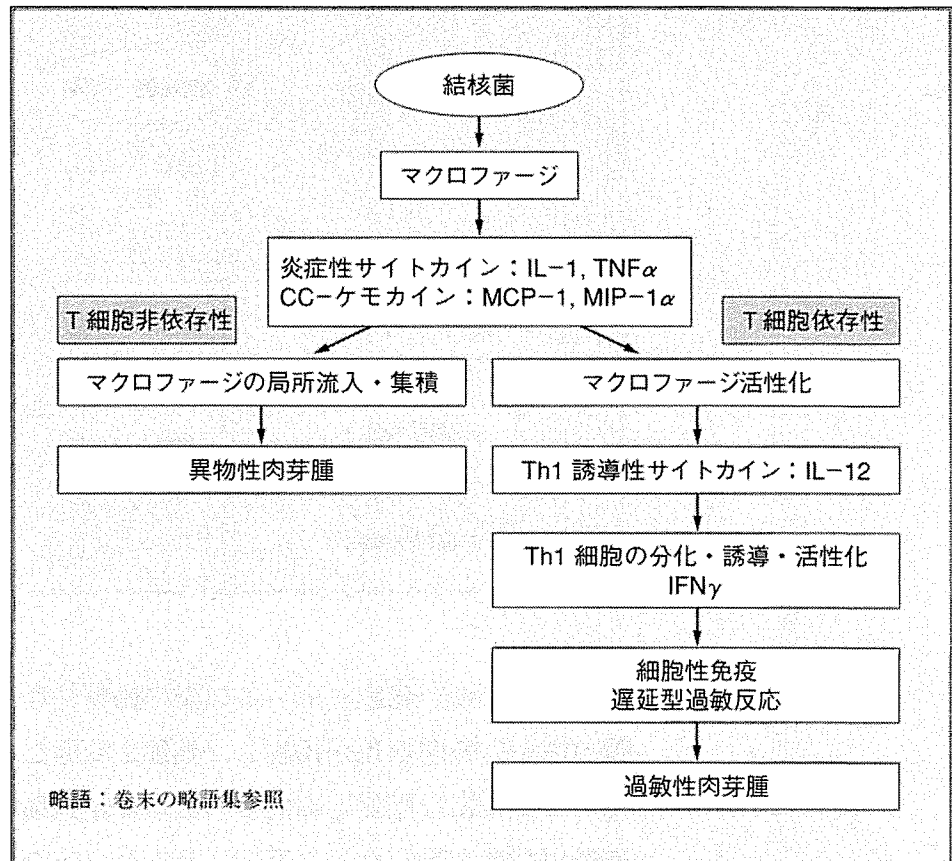


結核性肉芽腫炎症と免疫応答

結核病変の特徴である肉芽腫病変の本態は、排除不能な異物もしくは病原体を局所に封じ込め、あるいは宿主組織に害を及ぼすことなく、高濃度の効果機能分子を作用させるために誘導される限局性慢性炎症である。肉芽腫は、発症機序により、T細胞免疫応答非依存性異物性肉芽腫と依存性過敏性肉芽腫に分類される。初期感染において殺菌できない結核菌を封じ込めるため、マクロファージは $\text{TNF}\alpha$ や IL-1 などの炎症性サイトカイン産生と、それらのサイトカインによって誘導される単球走化性タンパク質 (MCP-1 ; CCL2) やマクロファージ炎症性タンパク (MIP-1 ; CCL3 , CCL4) を介して、病巣への単球/マクロファージの流入・集積を促し、異物性肉芽腫を形成する^{8~11)}。他方、獲得免疫応答の結果産生される $\text{IFN}\gamma$ は肉芽腫病変内マクロファージから $\text{IFN}\gamma$ 誘導性モノカイン (MIG ; CXCL9) や $\text{IFN}\gamma$ 誘導性タンパク-10 (IP-10 ; CXCL10)、 $\text{IFN}\gamma$ 誘導性T細胞遊走因子 α (I-TAC ; CXCL11) などの産生を介して、Th1細胞の肉芽腫内集積を惹起し、過敏性肉芽腫反応を誘導する¹²⁾。したがって、結核性肉芽腫病変は成因論的に両者が複合した混合性肉芽腫病変である(図2)。

結核性肉芽腫形成における菌側因子として、抗酸菌細胞壁に存在する糖脂質が注目されている。特にアシル化トレハロース脂質化合物である trehalose 6, 6'-dimycolate (TDM)/code factor やスルホリピ

図2 結核性肉芽腫炎症の細胞・機能分子機序

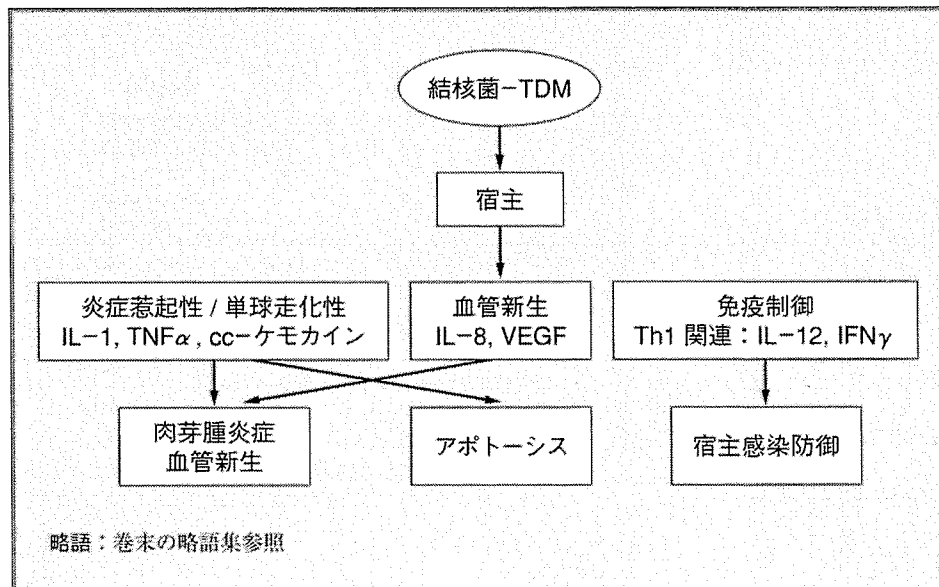


ド (SL) が宿主防御機能を修飾し、結核菌の病原性に関与している。TDM と SL は貪食マクロファージ内でリソソームと結核菌を含む食胞の融合を阻害する。さらに、TDM は結核と同じ混合性肉芽腫性炎症を誘導する¹⁰⁾。また、肉芽腫形成に病変局所における末梢血細胞の流入、すなわち血管因子が必須であるが、TDM は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を誘導し、血管新生にも寄与している¹³⁾。加えて、TDM はリンパ組織の宿主免疫担当細胞にアポトーシスを誘導し、自己反応性 T 細胞の除去、Th1 / Th2 細胞の分化を抑制することにより自己免疫疾患の発症を抑制している可能性がある (図 3)¹⁴⁾。すなわち、TDM は結核菌-宿主関係における多機能分子である。

通常の初期感染において肉芽腫に封じ込められた結核菌は、増殖に必要な酸素分圧の低下によって休眠を余儀なくされる。この病変は小型で、咳嗽や喀痰など臨床症状を伴わず、胸部 X 線検査でわずかに認められる初期病巣として知られている。

免疫能低下などで結核菌が休眠から再活性化すると、内因性再燃に

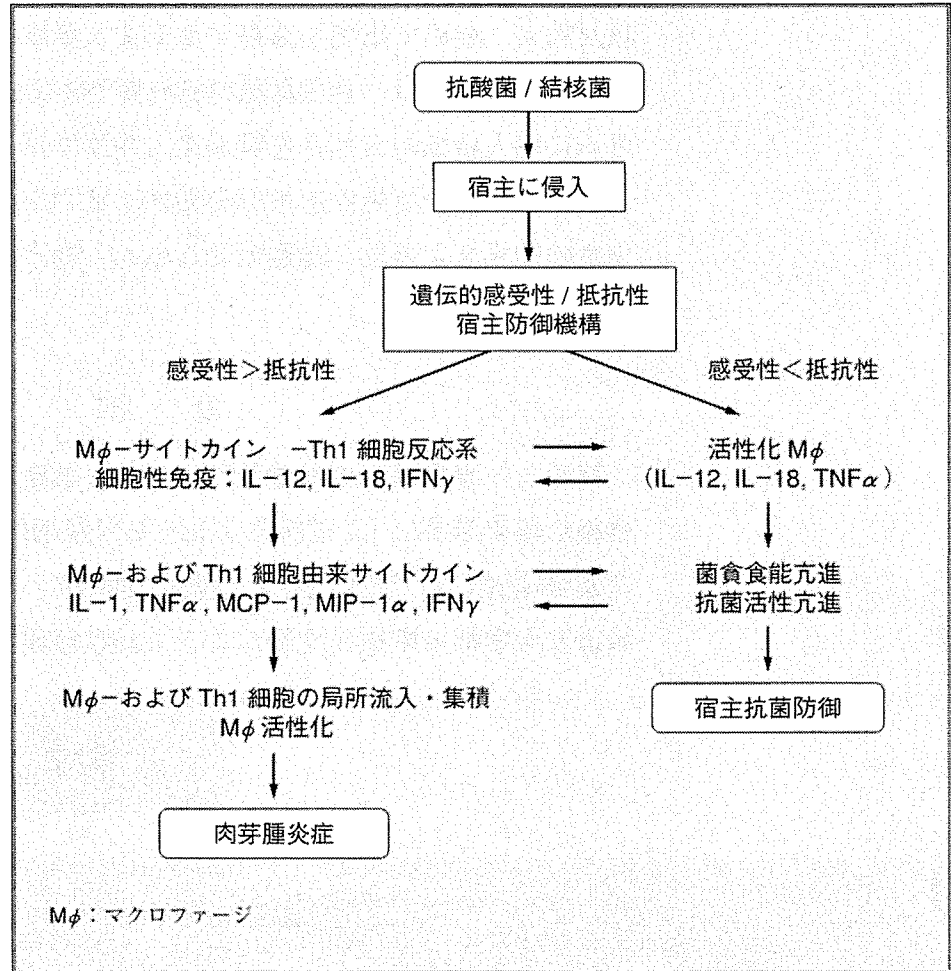
図3 結核菌細胞壁 TDM と宿主応答の分子機序



よる二次結核を発症する。この型の結核性肉芽腫の特徴として、肉芽腫の中心に乾酪壊死が出現し、外部と交通して空洞ができる。乾酪壊死による豊富な脂質と高濃度の酸素は結核菌の増殖に適しており、臨床的な結核を発症するに至る。しかし、AIDS 患者¹⁵⁾ や T 細胞欠損動物¹⁶⁾ など T 細胞性免疫に欠陥がある場合、乾酪壊死や空洞形成が認められないことから、T 細胞免疫が結核の病態に負の役割を演じていることが推察される。したがって、結核菌に対する遅延型過敏反応を含む細胞性免疫応答は、抗結核防御と組織障害、すなわち功罪の二面性を持つ諸刃の剣であると考えられる¹⁷⁾。以上のことから、宿主生体防御と結核菌増殖のバランスによって、結核の病態が形成されることが分かる (図 4)。この平衡状態が生涯続く場合には結核を発症しない。しかし、潜伏感染における免疫応答、あるいは再燃の防御に働く免疫応答については十分に明らかになっていない。

結核の再燃を阻止する免疫応答が、初期感染に有効な免疫応答と異なる理由として、抗酸菌が増殖期と休眠期に発現する遺伝子を著しく変化させる可能性が挙げられる。遅延発育型抗酸菌が定常期や休眠期において最も大量に発現するタンパク質である mycobacterial DNA-binding protein-1 (MDP1) は、抗酸菌体内や表層に存在する抗酸菌特異的タンパク質である。機能的に細胞内 MDP1 は核酸結合性を有し、転写および翻訳阻害活性を持ち、そのため休眠機構、さらに潜

図4 抗酸菌 / 結核菌感染における宿主細胞および機能分子応答機構



伏感染に関与していることが示唆されている。他方、菌表層 MDP1 が宿主細胞表面に存在するムコ多糖（グルコサミノグルカン）、特にヒアルロン酸に結合し、MDP1 が抗酸菌の宿主細胞への接着 / 侵入に関与する接着分子であることが判明¹⁸⁾し、加えて、宿主が MDP1 に対し Th1 細胞応答など防御免疫を発現すること¹⁹⁾が判明し、今後の治療・予防標的候補として期待される。

おわりに

結核菌感染において、結核菌の Th1 誘導能によって、細胞性免疫応答が成立し発症を阻止する。しかし、結核菌が潜伏感染し、細胞性免疫の負の側面である DTH による肉芽腫が必ずしも宿主に有利に働かないため、結核の増殖は抑制できるが、感染宿主における結核菌の完全排除はできず、免疫能が低下すると結核を発症する。初期感染と

再燃結核の防御に必要な免疫応答は異なることが予想され、現在の結核対策上、極めて重要な課題である成人肺結核に対するワクチンや治療戦略の開発には、休眠状態の結核菌で特異的に発現する分子の探索、さらに成人結核の大部分を構成する内因性再燃や外来性再感染による二次結核に有効な免疫応答の解明が必要であろう。結核菌-宿主防御免疫の関係をより良く理解することが、結核の制圧戦略を構築するうえで必須である。

謝 辞

筆者らの研究は厚生労働省厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）、文部科学省科学研究費補助金（特定領域研究および基盤研究C）、日米医学協力研究会結核・ハンセン病専門部会、大阪市立大学都市問題研究費および大阪結核研究会により支援された。

阿 戸 学・小林和夫

文 献

- 1) Hingley-Wilson SM, et al: Survival perspectives from the world's most successful pathogen. *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunol* 4 (10): 949-955, 2003.
- 2) Smith I: *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 16 (3): 463-496, 2003.
- 3) Hackam DJ, et al: Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nrampl) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med* 188 (2): 351-364, 1998.
- 4) Kaufmann SH: Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* 6 (9): 955-960, 2000.
- 5) Brigl M, et al: CDI: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22: 817-890, 2004.
- 6) Kaufmann SH: Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol* 26 (12): 660-667, 2005.
- 7) North RJ, et al: Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 22: 599-623, 2004.
- 8) Kobayashi K, et al: Strain variation of bacillus Calmette-Guerin-induced pulmonary granuloma formation is correlated with anergy and the local production of migration inhibition factor and interleukin 1. *Am J Pathol* 119 (2): 223-235, 1985.
- 9) Sato IY, et al: Regulation of *Mycobacterium bovis* BCG and foreign body granulomas in mice by the Bcg gene. *Infect Immun* 58 (5): 1210-1216, 1990.
- 10) Yamagami H, et al: Trehalose 6, 6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body-and hyper-

- sensitivity-type granulomas in mice. *Infect Immun* 69 (2): 810-815, 2001.
- 11) Kasahara K, et al: Selective expression of monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein 1 in human blood monocytes by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 170 (5): 1238-1247, 1994.
 - 12) Fuller CL, et al: In situ study of abundant expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pulmonary granulomas that develop in cynomolgus macaques experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 71 (12): 7023-7034, 2003.
 - 13) Saita N, et al: Trehalose 6, 6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. *Infect Immun* 68 (10): 5991-5997, 2000.
 - 14) Hamasaki N, et al: In vivo administration of mycobacterial cord factor (Trehalose 6, 6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect Immun* 68 (6): 3704-3709, 2000.
 - 15) Long R, et al: The chest roentgenogram in pulmonary tuberculosis patients seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *Chest* 99 (1): 123-127, 1991.
 - 16) Ehlers S, et al: Alphabeta T cell receptor-positive cells and interferon-gamma, but not inducible nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria-induced pulmonary immunopathology. *J Exp Med* 194 (12): 1847-1859, 2001.
 - 17) Kobayashi K, et al: Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc Res Tech* 53 (4): 241-245, 2001.
 - 18) Aoki K, et al: Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem* 279 (38): 39798-39806, 2004.
 - 19) Matsumoto S, et al: DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 175 (1): 441-449, 2005.

Studies of Lipoproteins of *Mycobacterium leprae*

Yumi Maeda^{1)*}, Patrick J. Brennan²⁾ and Masahiko Makino¹⁾

1) Department of Microbiology, Leprosy Research Center

2) Department of Microbiology, Colorado State University

[Received: 1 Dec. 2003]

Key words: lipoproteins, mycobacteria, host defense, cytokine

The deciphering of the genomic sequence of *Mycobacterium leprae* has made possible to predict the possible lipoproteins. The consensus sequence at the N-terminal region of the protein, including the cysteine residue to which the lipid moiety gets attached, provides a clue to the search. As such, more than 20 putative lipoproteins have been identified from *Mycobacterium leprae* genomic sequence. Lipoprotein LpK (*Accession no. ML0603*) which encodes for 371 amino acid precursor protein, was identified. Expression of the protein, in *Escherichia coli* revealed a 33 kD protein, and metabolic labeling experiments proved that the protein was lipidated. The purified lipoprotein was found to induce production of IL-12 in human peripheral blood monocytes which may imply that *M. leprae* LpK is involved in protective immunity against leprosy. Pursuit of such lipoproteins may reveal insights into the pathogenesis of the disease.

Introduction

According to World Health Organization (WHO) epidemiological survey report, the number of leprosy patients in the world was around 534000 at the beginning of 2003, as reported by 110 countries. About 620000 new cases were detected during 2002 (<http://www.who.int/lep/>). In spite of the intensive leprosy control measures taken, there is no evidence as yet of a reduction in the number of new cases¹⁾. The situation implies that there is a need to develop new vaccines and immunotherapeutic tools to con-

trol the disease. Moreover there is increased concern about the disease due to the complications due to severe reactions, peripheral nerve injury due to the tropism of the bacilli to invade Schwann cells²⁻⁴⁾ and emergence of drug resistant bacilli⁵⁾.

Bacterial lipoproteins containing N-acyl diglyceride-cysteine residues, flanked by characteristic amino acids motif that are required for post-translational processing via the signal peptidase II^{6, 7)}, have been extensively studied in Gram-positive and Gram-negative bacteria. Membrane located 17 kD lipoprotein of *Francisella tularensis* reported by Sjosted *et al.* was found to be T cell stimulatory^{8, 9)}. Lipoproteins released by pathogenic *E. coli*, *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica*, were found to induce proinflammatory cytokine in macrophages and ameliorate pathologic changes associated with gram negative bacterial infection in mice¹⁰⁾.

*Corresponding author :

Department of Microbiology, Leprosy Research Center,
National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1 Aoba-cho,
Higashimurayama, Tokyo 189-0002, Japan
Tel: 042-391-8211 Fax: 042-394-9092
E-mail address: yumi@nih.go.jp

Borrelia burgdorferi and *Treponema pallidum*, the etiological agents of Lyme disease and syphilis, respectively, are known to possess abundant lipoproteins¹¹, which act as major antagonists with the ability to influence both innate and adaptive immune responses during infection¹². The only two well studied mycobacterial lipoproteins, are the 19 kD and 38 kD lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*¹³⁻¹⁵. These lipoproteins are therefore presumed to be involved in the host responses, inducing interleukin-12 (IL-12) from the host cells. Since IL-12 has T cell stimulatory properties, which in turn elicits production of interferon- γ (IFN- γ), and facilitates development of Th1 cells¹⁶⁻¹⁸, these lipoproteins may be involved in the induction of cellular responses to mycobacteria and thereby contributing to the development of protective immunity^{19,20}. Identification of lipoproteins in *M. leprae* seems inevitable especially in terms of host defense and for the development of new vaccines against leprosy.

Analysis of a *M. leprae* lipoprotein

To date, relatively few lipoproteins of mycobacteria have been described. The database of the *M. tuberculosis* genome (http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis/) revealed that there are about a hundred putative lipoprotein coding genes, but only about 40 genes have been identified in *M. leprae* genome²¹ and almost half of the genes identified are pseudogenes. Table 1 shows the list of the putative lipoproteins. One of the predictable lipoprotein was found to be partially homologous to the precursor of the glutamine binding protein, the other one was a possible transport lipoprotein and the third one was a putative secreted protease. But all other lipoproteins had no homology to any other protein of known function. One of the more interesting candidates is the gene annotated as *lpk* (Accession No. ML0603)²². The N-terminal residues of LpK showed typical features of a signal peptide with a consensus sequence (MISALMVAVAC) for the lipid modification. A sequence homologue of *lpk* was identified in

the *M. tuberculosis* genome database using the BLASTN search tool. *M. tuberculosis* Rv 2413c (EMBL:AL123456, 316 amino acids) has 83.5% identity in the 316 amino acid overlap. However, the homologue has no consensus sequence for lipid modification. The fact that the lipid consensus sequence was missing is quite surprising since many of the *M. leprae* genes when compared to those of *M. tuberculosis* genes are pseudogenes as analyzed from the gene databases²¹. This fact may indicate that this lipoprotein may be specific to *M. leprae* and have a significant role in bacteria, specifically related to the unique features of the organism such as proclivity for Schwann cell invasion or development of reactions. Since it is not feasible to obtain adequate amount of protein from *M. leprae* for analyses, the gene was cloned and the protein expressed and purified in *E. coli* (Fig.1). The basic lipoprotein nature of LpK was verified experimentally. Metabolic labelling of the bacterial protein with radioactive glycerol provided presumptive evidence of a covalent linkage of lipid to LpK.

Murine experiments with infectious pathogens, indicate that IL-12 plays an important role in initiation and regulation of the T cell responses such as Th1^{23,24}. *In vitro* experiments with *M. tuberculosis* suggested that IL-12 is induced rapidly after infection^{16,25,26}, and in *in vivo* IL-12 was crucial for the development of protective immunity against tuberculosis²⁷. When we examined whether IL-12 was inducible by LpK in human monocytes, LpK induced IL-12 at a significantly high level, a level that could be maintained even in the presence of polymyxin B (Fig. 2). Another *M. leprae* putative lipoprotein (gene product of Accession No. ML1699) was expressed in inclusion bodies of *E. coli*. The purified protein, of molecular weight 39 kD, did not induce any significant amount of IL-12 in human monocytes. The reason for non-inducing capability of the purified 39 kD protein, may be the lack of lipidified region, although the exact reason remains unclear.

Discussion

M. tuberculosis 19 kD lipoprotein is both cell wall associated and secreted lipoprotein which stimulate proliferation of human T cells and promotes neutrophil priming and activation^{14,28}. It is also known to induce apoptosis in macrophages through TLR2 ligation²⁹. Recently, the synthetic lipopeptide consisting of the N-terminal portion of *M. leprae* 19 kD lipoprotein is shown to induce apoptosis in human Schwann cells, also through TLR2³⁰. At present, TLR2 seems to be the only receptor known to be involved in signaling of bacterial lipoproteins and lipopeptides³¹. In likewise manner, TLR2 seems to be the receptor on antigen presenting cell, which is involved in *M. leprae* LpK lipoprotein signaling. But blocking of TLR2 with its antagonistic antibody does not completely inhibit the T cell activating ability of lipoprotein. Therefore other receptors as yet unknown, may be required for the signaling. Also, TLR2 seems to associate with TLR1 and recognise the native 19 kD *M. tuberculosis* lipoprotein and synthetic triacylated but not the diacylated lipopeptide^{32, 33}. Such type of inter-related receptors may also be worth investigating.

Display of outer surface protein A (OspA) antigen as membrane associated lipoprotein by *M. bovis* bacillus Calmette-Guerin seem to be necessary for protection against *Borrelia burgdorferi* infection (Lyme disease)³⁴. But there are a few reports which considers the involvement of lipoprotein deleterious to protection against disease³⁵. Therefore it would be necessary to see whether the display of *M. leprae* lipoproteins could enhance host defense-associated immunity as well as serve in protection against the disease in *in vivo*.

IL-12 production in mycobacterial diseases is known to contribute to antimycobacterial defenses^{17,36,37}, by triggering of interferon- γ which, in turn, can reduce, for example, the bacillary load in lepromatous leprosy patients¹⁶. In this respect, we can anticipate that lipoproteins may have the potential to be used as an immunotherapeutic agent against lep-

rosy. We may have to investigate the IL-12 inducing ability of other lipoproteins of *M. leprae* and the detailed mechanism by which the signal is transduced.

In conclusion, LpK, induced the production of IL-12 which may indicate a significant role in the induction of cellular responses leading to the development of protective immunity against the intracellular organism. Although the engagement of lipoproteins in the pathogenesis of leprosy is still to be evaluated, ongoing studies are conducted to evaluate its immunogenic role on leprosy.

Acknowledgements

The work was supported in part by grants from Health Science Research Grants- Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, and Japan Health Sciences Foundation, from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. The authors are grateful to the members of the Japanese Leprosy Association for the article award.

References

- 1) World Health Organisation. Leprosy-Global situation. Wkly Epidemiol Rec 77: 1-8, 2002.
- 2) Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- α 2 chain. Cell 88: 811-821, 1997.
- 3) Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. Cell 103: 511-524, 2000.
- 4) Job CK. Nerve damage in leprosy. Int J Lepr Other Mycobact Dis 57: 532-539, 1989.
- 5) Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, Hashimoto K, Kimura H, Kobayashi K, Kashiwabara Y. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. Antimicrob Agents and Chemotherap 45: 3635-3639, 2001.
- 6) Wu HC, Tokunaga M. Biogenesis of lipoproteins in

- bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* 125: 127-157, 1986.
- 7) Sankaran K, Wu HC. Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* 269: 19701-19706, 1994.
 - 8) Sjostedt A, Tarnvik A, Sandstrom G. The T-cell-stimulating 17-kilodalton protein of *Francisella tularensis* LVS is a lipoprotein. *Infect Immun* 59: 3163-3168, 1991.
 - 9) Sjostedt A, Sandstrom G, Tarnvik A. Humoral and cell-mediated immunity in mice to a 17-kilodalton lipoprotein of *Francisella tularensis* expressed by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 60: 2855-2862, 1992.
 - 10) Zhang H, Niesel DW, Peterson JW, Klimpel GR. Lipoprotein release by bacteria: Potential factor in bacterial pathogenesis. *Infect Immun* 66: 5196-5201, 1998.
 - 11) Radolf JD, Arndt LL, Akins DR, Curetty LL, Levi ME, Shen Y, Davis LS, Norgard MV. *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. *J Immunol* 154: 2866-2877, 1995.
 - 12) Infante-Duarte C, Kamradt T. Lipopeptides of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins induce Th1 phenotype development in alphabeta T-cell receptor transgenic mice. *Infect Immun* 65: 4094-4099, 1997.
 - 13) Oftung F, Wiker HG, Deggerdal A, Mustafa AS. A novel mycobacterial antigen relevant to cellular immunity belongs to a family of secreted lipoproteins. *Scand J Immunol* 46: 445-451, 1997.
 - 14) Young DB, Garbe TR. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 142: 55-65, 1991.
 - 15) Mohagheghpour N, Gammon D, Kawamura LM, van Vollenhoven A, Benike CJ, Engleman EG. CTL response to *Mycobacterium tuberculosis*: identification of an immunogenic epitope in the 19-kDa lipoprotein. *J Immunol* 161: 2400-2406, 1998.
 - 16) Zhang M, Gately MK, Wang E, Gong J, Wolf SF, Lu S, Modlin RL, Barnes PF. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest* 93: 1733-1739, 1994.
 - 17) Sieling PA, Wang XH, Gately MK, Oliveros JL, McHugh T, Barnes PF, Wolf SF, Golkar L, Yamamura M, Yogi Y, et al. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J Immunol* 153: 3639-3647, 1994.
 - 18) Vordemeier HM, Harris DP, Roman E, Lathigra R, Moreno C, Ivanyi J. Identification of T cell stimulatory peptides from the 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 147: 1023-1029, 1991.
 - 19) Ngamyng M, Varachit P, Phaknilrat P, Levy L, Brennan PJ, Cho SN. Effects of vaccination with several mycobacterial proteins and lipoproteins on *Mycobacterium leprae* infection of the mouse. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 69: 43-45, 2001.
 - 20) Fonseca DP, Benaissa-Trouw B, van Engelen M, Kraaijeveld CA, Snippe H, Verheul AF. Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-cell epitopes of the 38-kilodalton protein. *Infect Immun* 69: 4839-4845, 2001.
 - 21) Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409: 1007-1001, 2001.
 - 22) Maeda Y, Makino M, Crick DC, Mahapatra S, Srisungnam S, Takii T, Kashiwabara Y, Brennan PJ. Novel 33-kilodalton lipoprotein from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 70: 4106-4111, 2002.
 - 23) Dockrell HM, Young SK, Britton K, Brennan PJ, Rivoire B, Waters MF, Lucas SB, Shahid F, Dojki M, Chiang TJ, Ehsan Q, McAdam KP, Hussain R.